

[文章编号] 1000-1182(2010)06-0587-04

## 成纤维细胞生长因子3基因多态性与 非综合征型唇腭裂的相关性研究

孙衍波<sup>1</sup> 郭胜胜<sup>1</sup> 黄永清<sup>1,2</sup> 马敏<sup>2</sup> 马坚<sup>2</sup> 任红旺<sup>1</sup> 高军<sup>3</sup> 石冰<sup>4</sup>

(1.宁夏医科大学口腔医院 口腔颌面外科; 2.宁夏医科大学附属医院 口腔颌面外科;

3.银川市口腔医院 口腔颌面外科, 宁夏 银川 750004;

4.四川大学华西口腔医学院 口腔颌面外科学教研室, 四川 成都 610041)

**[摘要]** 目的 探讨成纤维细胞生长因子3(FGF3)基因rs4980700、rs4631909单核苷酸多态性(SNP)与非综合征型唇腭裂(NSOC)的相关性。方法 收集186例非综合征型唇腭裂患者, 患者父亲183例, 母亲174例, 核心家系172个; 200例正常新生儿为对照组。采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法检测FGF3基因rs4980700与rs4631909多态位点基因型, 并进行病例对照分析, 传递不平衡检验(TDT)和以家系为基础的相关性分析(FBAT)。结果 病例组rs4980700多态位点基因型和等位基因频率与对照组比较存在统计学差异( $P<0.05$ ); 病例组rs4631909多态位点基因型和等位基因频率与对照组比较存在统计学差异( $P<0.05$ ), 而在腭裂组则无统计学差异( $P=0.49$ )。传递不平衡研究发现, FGF3基因rs4980700位点的G等位基因与rs4631909位点的C等位基因在本研究人群非综合征型唇腭裂患者中存在过传递( $P<0.05$ )。FBAT分析rs4980700、rs4631909多态位点与本研究人群非综合征型唇腭裂存在相关性( $P<0.05$ )。结论 FGF3基因rs4980700、rs4631909多态位点与非综合征型唇腭裂存在相关性。

**[关键词]** 非综合征型唇腭裂; 成纤维细胞生长因子3; 单核苷酸多态性

**[中图分类号]** R 782.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2010.06.004

**Association between fibroblast growth factor 3 polymorphism and non-syndromic oral clefting** SUN Yan-bo<sup>1</sup>, GUO Sheng-sheng<sup>1</sup>, HUANG Yong-qing<sup>1,2</sup>, MA Min<sup>2</sup>, MA Jian<sup>2</sup>, REN Hong-wang<sup>1</sup>, GAO Jun<sup>3</sup>, SHI Bing<sup>4</sup>. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, College of Stomatology, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 3. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, Yinchuan Stomatological Hospital, Yinchuan 750004, China; 4. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the association between fibroblast growth factor 3(FGF3) gene rs4980700 and rs4631909 polymorphism and non-syndromic oral clefting(NSOC). **Methods** Blood samples from 186 NSOC patients, patients' parents and 200 controls were collected. DNA was extracted and PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP) was used to identify genotypes of the samples. Case-control analyses and transmission disequilibrium test(TDT) and family based association test(FBAT)analyses were also carried out. **Results** In case-control analysis, there were significant differences in rs4980700 genotype and allele among NSOC patients compared with the control group( $P<0.05$ ) and there were significant differences in rs4631909 genotype and allele among NSOC patients compared with the control group( $P<0.05$ ), but no difference in cleft palate only( $P=0.49$ ). In TDT, the G allele of rs4980700 had an overtransmission( $P<0.05$ ) and the C allele of rs4631909 had an overtransmission( $P<0.05$ ) in NSOC. FBAT analysis also showed a significant association between FGF3 gene rs4980700, rs4631909 polymorphism and NSOC. **Conclusion** FGF3 gene rs4980700 and rs4631909 polymorphism were associated with NSOC.

**[Key words]** nonsyndromic oral clefts; fibroblast growth factor 3; single nucleotide polymorphism

[收稿日期] 2009-09-25; [修回日期] 2009-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30660198); 2009年国家教育部春晖计划启动基金资助项目(Z2008-1-7520)

[作者简介] 孙衍波(1983—), 男, 山东人, 硕士

[通讯作者] 黄永清, Tel: 0951-6743384

非综合征型唇腭裂(non-syndromic oral clefting, NSOC)是常见的先天性颌面部发育畸形, 其出生率在不同地区和人群中存在差异, 而以亚洲人群发病率较高<sup>[1]</sup>。流行病学调查<sup>[2]</sup>结果表明, 我国发病率为

1.62/1 000。其病因复杂,通常认为是由遗传、环境以及两者的交互作用引起<sup>[3]</sup>。近来信号通路及信号分子在唇腭裂疾病中所起的作用受到重视。Bridget等<sup>[4]</sup>已发现成纤维细胞生长因子3(fibroblast growth factor 3, FGF3)基因多态性与NSOC的发病存在相关性,而目前国内尚未见该基因多态性与我国NSOC疾病相关性的报道。本研究选择FGF3基因rs4980700与rs4631909多态位点,研究其与非综合征型唇腭裂的相关性。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验对象

本研究的病例组样本来源于2006—2009年就诊于宁夏医科大学附属医院,银川市口腔医院的NSOC核心家系(家族3代以上为宁夏人),其中唇裂患者41例,腭裂56例,唇腭裂89例,患者父亲183例,患者母亲174例,完整核心家系172个。所有病例均排除了其他先天性系统畸形或综合征型唇腭裂。签订书面知情同意后,采集患者及其父母的外周全血5 mL,并填写问卷调查表。对照组样本收集同时期正常新生儿脐带血200例(无全身遗传性疾病,无家族遗传性疾病史,性别、民族和出生地区尽可能与病例组匹配)。

### 1.2 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)

将采集的5 mL外周静脉血,ACD抗凝。试剂盒提取DNA,对2个多态位点进行扩增。rs4980700等位基因G/A引物序列F 5'-CTATTATTTACAGACCTTT-TACCAGCT-3', R 5'-TGGCCTTAGTCACTTCTGTT-ATTTG-3'; rs4631909等位基因C/T引物序列F 5'-TG-GAATGTGGCTGGGATA-3', R 5'-ACTGGGAGTG-GAGGGTCA-3'。限制性内切酶 *Pvu* , *Btg* 分别消化2种PCR产物,将酶切产物进行质量分数2%琼脂糖凝胶电泳,分析记录基因型,并随机抽取10%的样本PCR扩增后直接测序,同时设立阳性内对照以验证基因分型的正确性。

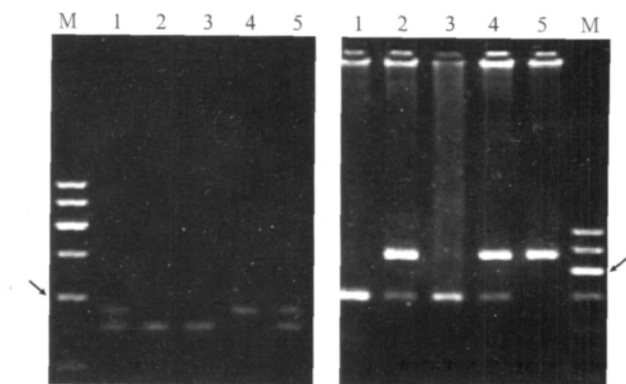
### 1.3 统计分析

对患者双亲及对照组基因型进行Hardy-Weinberg平衡检验,利用SPSS 11.5软件对患者及其父母等位基因和基因型与对照组比较分析,采用传递不平衡检验(transmission disequilibrium test, TDT)及Family Based Association Test(FBAT1.7.2)软件(www.biostat.harvard.edu/~fbat/fbat.htm),分析FGF3基因rs4980700与rs4631909多态位点与非综合征型唇腭裂的关系,同时进行2点间的单倍型分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR-RFLP方法基因分型

运用PCR-RFLP方法对rs4980700与rs4631909多态位点分型。在本研究人群中,可分别见到3种基因型,GG、GA、AA与CC、CT、TT,见图1。



左为M: 100 bp的DNA Marker,箭头所指为200 bp条带;2、3: 纯合子GG;1、5: 杂合子GA;4: 纯合子AA。右为M: 100 bp的DNA Marker,箭头所指为400 bp条带;1、3: 纯合子CC;2、4: 杂合子CT;5: 纯合子TT。

图1 FGF3基因rs4980700与rs4631909位点的PCR-RFLP电泳结果

Fig 1 Restriction fragment length polymorphism patterns for FGF3 rs4980700 and rs4631909

### 2.2 PCR测序结果

随机选取10%的标本PCR后进行直接测序,测序结果与采用PCR-RFLP方法分型结果一致。

### 2.3 Hardy-Weinberg平衡检验

对患者父母以及对照组基因型进行Hardy-Weinberg平衡检验,结果显示其基因型频率分布符合Hardy-Weinberg平衡,见表1。

### 2.4 病例-对照分析

病例组rs4980700多态位点GG基因型频率和G等位基因频率与对照组比较存在统计学差异( $P<0.05$ );病例组rs4631909多态位点CC基因型频率和C等位基因频率与对照组比较存在统计学差异( $P<0.05$ ),而在腭裂组则无统计学差异( $P=0.49$ ),见表1。

### 2.5 TDT分析

将双亲中含有杂合子信息的家庭进行传递不平衡分析,结果显示:rs4980700多态位点的G等位基因存在过传递,rs4631909多态位点的C等位基因存在过传递,见表2。

### 2.6 FBAT分析

设定参数为:FBAT设定为基因型模型(model genotype)、双等位遗传模型(model bi-allelic)进行相关性分析。rs4980700和rs4631909两点单倍型分析中发现,存在两个有意义的单倍型G-C与A-T( $P<0.05$ )。

表 1 基因型与等位基因分布、比较以及其Hardy-Weinberg平衡检验结果

Tab 1 Genotypic and allelic distributions and comparisons and tests of Hardy-Weinberg equilibrium

项目	唇裂	腭裂	唇腭裂	父亲	母亲	对照组
rs4980700						
GG	23(56.10%)	30(53.57%)	47(52.81%)	77(42.08%)	70(40.23%)	69(34.50%)
GA	13(31.71%)	18(32.14%)	26(29.21%)	76(41.53%)	78(44.83%)	96(48.00%)
AA	5(12.19%)	8(14.29%)	16(17.98%)	30(16.39%)	26(14.94%)	35(17.50%)
$\chi^2(P\text{值})$	6.73(0.04)	6.85(0.03)	10.30(0.01)	2.40(0.30)	1.40(0.50)	
HW( $P\text{值}$ )				2.24(0.13)	0.31(0.58)	0.03(0.87)
G	59(71.95%)	78(69.64%)	120(67.42%)	230(62.84%)	218(62.64%)	234(60.75%)
A	23(28.05%)	34(30.36%)	58(32.58%)	136(37.16%)	130(37.36%)	166(41.50%)
$\chi^2(P\text{值})$	5.17(0.02)	4.56(0.03)	4.13(0.04)	1.51(0.22)	1.34(0.25)	
GG与GA/AA基因型与对照组比较						
OR	2.426	2.191	2.125	1.379	1.278	
95% CI	1.23~4.80	1.20~3.99	1.28~3.53	0.91~2.09	0.84~1.95	
rs4631909						
CC	24(58.54%)	19(33.93%)	51(57.30%)	71(38.80%)	62(35.63%)	65(32.50%)
CT	11(26.83%)	25(44.64%)	21(23.60%)	87(47.54%)	92(52.87%)	104(52.00%)
TT	6(14.63%)	12(21.43%)	17(19.10%)	25(13.66%)	20(11.50%)	31(15.50%)
$\chi^2(P\text{值})$	10.78(0.01)	1.41(0.49)	21.41(0.00)	1.88(0.39)	1.38(0.50)	
HW( $P\text{值}$ )				0.04(0.84)	2.68(0.10)	0.01(0.92)
C	59(71.95%)	63(56.25%)	123(69.10%)	229(62.57%)	216(62.07%)	234(58.50%)
T	23(28.05%)	49(43.75%)	55(30.90%)	137(37.43%)	132(37.93%)	166(41.50%)
$\chi^2(P\text{值})$	5.17(0.02)	0.18(0.67)	5.86(0.02)	1.32(0.25)	1.00(0.32)	
CC与CT/TT基因型与对照组比较						
OR	2.932	1.067	2.787	1.317	1.150	
95% CI	1.47~5.84	0.57~2.00	1.67~4.66	0.87~2.00	0.75~1.77	

表 2 传递不平衡分析

Tab 2 Transmission disequilibrium test analysis

项目	唇裂		腭裂		唇腭裂		合计	
	传递	不传递	传递	不传递	传递	不传递	传递	不传递
rs4631909								
C	25	13	31	19	82	53	138	85
T	18	35	28	34	26	60	72	129
$\chi^2(P\text{值})$	9.00(0.003)		3.15(0.076)		19.57(0.000)		28.73(0.000)	
OR	3.739		1.981		3.752		2.909	
95% CI	1.553~9.004		0.927~4.233		2.169~6.490		1.959~4.319	
rs4980700								
G	24	17	39	18	58	46	121	81
A	12	30	21	31	29	52	62	113
$\chi^2(P\text{值})$	7.59(0.006)		8.64(0.003)		7.29(0.007)		22.48(0.000)	
OR	3.529		3.198		2.261		2.732	
95% CI	1.416~8.798		1.457~7.024		1.245~4.106		1.792~4.137	

### 3 讨论

目前认为非综合征型唇腭裂是一种由遗传和环境因素相互作用所致的多基因、多因素遗传病<sup>[3]</sup>。学者已经发现了一些与非综合征型唇腭裂可能相关的基因。其中,IRF6基因与NSOC有较强的相关性,这一相关性已经得到证实<sup>[5-6]</sup>。而MSX1、TGF $\alpha$ 、RARA、MSX2和PVRL1等基因也得到了广泛的研究。近年来,信号分子在唇腭部发育及在唇腭裂发病中的作用受到了广泛重视。Bridget等<sup>[4]</sup>发现,FGF3基因与菲律宾人NSOC的发病具有相关性。本研究选择FGF3基因的多态位点rs4980700与rs4631909进行研究,探讨其与非综合征型唇腭裂的相关性。

FGF3属于FGF家族,是一种多肽生长因子。在脊椎动物中,FGF基因结构和氨基酸序列都高度保守,它与类肝素磷酸蛋白聚糖有较强的亲和力,并在硫酸类肝素的作用下激活FGF受体细胞表面,将信号传递到细胞内<sup>[7]</sup>。动物实验<sup>[8]</sup>已证明,敲除FGF3、FGF10基因的小鼠均可造成颅面部发育异常。由于唇和腭的发育需要细胞增殖、分化、迁移及凋亡之间的精确协调,并且受多种生长因子和调控因子的影响,故其中任何一个因素受干扰,都有可能引起唇腭裂的发生。这些干扰可来源于遗传因素、环境因素等。Menezes等<sup>[9]</sup>在巴西人群中也证实了FGF3基因与NSOC发病具有相关性。本研究所选取的2个SNP位于FGF3基因的3'端,虽然非编码区的SNP不会直接改变蛋白质序列功能,但它们可能影响基因的转录翻译过程,操控基因的表达。

本研究分析了186例患者,183例父亲,174例母亲,以及200例对照组FGF3基因的rs4980700、rs4631909多态位点的基因型及等位基因频率分布情况。其中rs4980700位点G等位基因频率为60.75%,略高于亚洲人群G(58.00%)等位基因的频率,而rs4631909位点C等位基因在对照组中的频率为58.50%,与亚洲人群C等位基因频率一致。

本研究运用病例对照和传递不平衡检验以研究FGF3基因SNP与NSOC患者的相关性,得到的结论与Bridget等<sup>[4]</sup>一致。结果显示,FGF3基因rs4980700多态位点的GG基因型以及G等位基因在唇裂组、腭裂组、唇腭裂组与对照组比较均有统计学差异( $P<0.05$ );rs4631909多态位点的CC基因型以及C等位基因在唇裂组以及唇腭裂组与对照组比较有统计学差异( $P<0.05$ )。TDT检验同样证实2个SNP中的G等位基因和C等位基因也相应的存在过传递。在本实验中,患儿双亲及对照组均遵循Hardy-Weinberg平衡,

并且运用以家系为基础的TDT检验,可消除患者群体与对照组基因遗传背景差异造成的影响,增强了统计结果的可信度。因此,本研究得出的FGF3基因rs4980700、rs4631909位点与NSOC存在相关性的结果具有较强的可靠性。

NSOC患者FGF3基因rs4980700多态位点GG基因型与另外两种基因型GA/AA比较相对危险度大于2,在rs4631909位点上CC基因型与CT/TT比较相对危险度大于2,提示G等位基因与C等位基因可能是NSOC发病的危险因素。在以核心家系为基础的FBAT分析中,rs4980700多态位点的AA基因型;rs4631909多态位点的CC、TT基因型与本研究人群NSOC的发生存在相关性( $P<0.05$ )。在单倍型分析中发现两个有意义的组合,分别为危险性单倍型G-C( $Z=3.05$ ,  $P=0.002$ )与保护性单倍型A-T( $Z=-2.44$ ,  $P=0.015$ )。

### [参考文献]

- [1] Mossey PA, Little J. Epidemiology of oral clefts: An international perspective[M]//Wyszynski DF. Cleft lip and palate: From origin to treatment. Oxford: Oxford University Press, 2002: 127-158.
- [2] 邱蔚六, 张震康. 口腔颌面外科学[M]. 5版. 北京: 人民卫生出版社, 2005 360-421.  
QIU Wei-liu, ZHANG Zhen-kang. Oral and maxillofacial surgery [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 360-421.
- [3] Murray JC. Gene/environment causes of cleft lip and/or palate [J]. Clin Genet, 2002, 61(4): 248-256.
- [4] Bridget M, Riley M, Mansilla A, et al. Impaired FGF signaling contributes to cleft lip and palate[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(11): 4512-4517.
- [5] 马坚, 黄永清, 马敏, 等. 中国西部人群IRF6基因V274 位点SNP与非综合征型唇腭裂相关性的研究[J]. 实用口腔医学杂志, 2008, 24(3): 417-421.  
MA Jian, HUANG Yong-qing, MA Min, et al. Association between IRF6 gene V274 and nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in West China[J]. J Pract Stomatol, 2008, 24(3): 417-421.
- [6] Huang Y, Wu J, Ma J, et al. Association between IRF6 SNPs and oral clefts in West China[J]. J Dent Res, 2009, 88(8): 715-718.
- [7] Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors[J]. Genome Biol, 2001, 2(3): 3005.
- [8] Ritva R, Spencer-Dene B, Connor EC, et al. Disruption of Fgf10/Fgf2b-coordinated epithelial-mesenchymal interactions causes cleft palate[J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1692-1700.
- [9] Menezes R, Letra A, Ruff J, et al. Studies of genes in the FGF signaling pathway and oral clefts with or without dental anomalies [J]. Am J Med Genet A, 2008, 146A(12): 1614-1617.

(本文编辑 汤亚玲)